

# 甲苯咪唑在鳗鲡体内的药物代谢及组织残留

李忠琴<sup>1</sup>, 关瑞章<sup>1</sup>, 许小平<sup>2</sup>

(1. 集美大学水产学院, 福建厦门 361021; 2. 福州大学生物医药研究所, 福州 350002)

[收稿日期] 2009 - 04 - 08 [文献标识码] A [文章编号] 1002 - 1280(2009)08 - 0013 - 05 [中图分类号] S859.84

**[摘要]** 采用反相高效液相色谱法定量检测抗鳗鲡拟指环虫药物甲苯咪唑及其代谢产物羟基甲苯咪唑和氨基甲苯咪唑。研究欧鳗经 1 mg/L 甲苯咪唑药浴处理后, 其皮肤、脂肪、肌肉、肝脏和肾脏中甲苯咪唑的代谢和残留情况。实验结果表明: 药浴时, 欧鳗在 24 h 内快速吸收药物, 皮肤上和脂肪中含有高浓度甲苯咪唑, 且甲苯咪唑在欧鳗肝脏和肾脏中转化成羟基甲苯咪唑和氨基甲苯咪唑, 其中氨基甲苯咪唑是主要代谢产物; 三种化合物在皮肤上的残留量明显高于肌肉; 鳗鱼可食用部位 (肌肉和皮肤) 中甲苯咪唑和羟基甲苯咪唑在 3 d 内代谢浓度降至药残最高限量 (0.1 mg/kg), 5 d 内可完全降解消除, 但氨基甲苯咪唑在停药 12 d 后的含量仍高于 0.1 mg/kg。

**[关键词]** 鳗鲡; 甲苯咪唑; 药物代谢; 药残分析; 高效液相色谱

## Studies on Metabolism and Residue of Veterinary Mebendazole in Eel with Bath Treatment

LI Zhong - qin<sup>1</sup>, GUAN Rui - zhang<sup>1</sup>, XU Xiao - ping<sup>2</sup>

(1. Fisheries College of Jimei University, Xiamen, Fujian 361021; 2. Institute of Biological Medicine, Fuzhou University, Fuzhou 350002; China)

**Abstract:** Mebendazole (MBZ) and its metabolites, hydroxy - mebendazole (MBZ - OH) and amino - mebendazole (MBZ - NH<sub>2</sub>), are analyzed by RP - HPLC, which is extensively used in eel culture for treatment of *Pseudodactylogynus* spp. infections. Drug metabolism and residue study were performed in European eels (*Anguilla anguilla*), bath - treated with MBZ at a dose of 1 mg/L for 24 hours. Skin, fat, muscle, liver and kidney tissue samples were collected at intervals during and after treatment and analyzed for MBZ, MBZ - OH and MBZ - NH<sub>2</sub>. Results showed that MBZ given to European eels via the water is absorbed rapidly and respectively reached highest levels within 24 hours, except liver in 12 hours. Skin and fat were found to contain the highest levels of the parent compound. MBZ is extensively metabolized to MBZ - OH and MBZ - NH<sub>2</sub> in liver and kidney, and MBZ - NH<sub>2</sub> is proved to be the major metabolite in the European eels. Skin contained higher residue levels for all three compounds, compared with muscle tissue. MBZ and MBZ - OH were eliminated within 5 days from the edible parts (muscle and skin) of the eels, whereas MBZ - NH<sub>2</sub> could be detected on the 12th day after the end of the treatment period.

**Key words:** eels; mebendazole; drug metabolism; residue study; RP - HPLC

基金项目: 农业部科研专项 (nyhyzx07 - 043); 福建省自然科学基金 (2008J0100); 集美大学博士科研启动基金 (ZQ2008015); 集美大学优秀青年骨干教师基金 (2008C001); 福建省科技计划重点项目 (2009N0046)

作者简介: 李忠琴 (1976年 - ), 女, 主要从事生物工程制药与水产病害防治研究。

甲苯咪唑 (Mebendazole, MBZ) 是苯并咪唑类广谱抗寄生虫的合成药物, 对寄生虫具有免疫调节和抑制糖酵解和生殖功能<sup>[1]</sup>, 在兽医临床上应用广泛。其分子式为  $C_{16}H_{13}N_3O_3$ , 化学名称二苯酮胍甲酯 (5-苯甲酰-2-苯并咪唑氨基甲酸甲酯)。近年在鳊鱼养殖中作为寄生虫感染的主要治疗药物, 尤其是欧洲鳊鱼, 寄生于鳃部的拟指环虫危害严重, 其感染率和感染强度高; 在治疗方面, 传统药物甲醛和敌百虫几乎无效, 而甲苯咪唑作为防治拟指环虫病的有效药物国内外均有报道<sup>[2-4]</sup>。随着国际市场对农产品质量要求不断提高, 渔药在水产品中的安全性受到极大关注。国内外对甲苯咪唑的残留要求的最高限量是  $0.1 \text{ mg/kg}$ <sup>[5]</sup>。甲苯咪唑在人类、绵羊、畜禽、鼠等生物体内的代谢和分布已有研究, 羟基甲苯咪唑 (Hydroxy-mebendazole, MBZ-OH) 和氨基甲苯咪唑 (Amino-mebendazole, MBZ-NH<sub>2</sub>) 是其主要的代谢产物<sup>[6-9]</sup>。但甲苯咪唑在鱼体内代谢的相关研究数据报道少<sup>[10-11]</sup>, 仅涉及其杀虫效果、毒性效应和在体内停留时间。本实验根据已报导的甲苯咪唑及其代谢产物的高效液相色谱检测方法<sup>[12-14]</sup>, 研究经甲苯咪唑药浴后 MBZ 及其代谢产物在欧鳊各组织器官的代谢分布规律和残留情况, 为合理用药和制定休药期提供科学理论依据。

## 1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 美国 Agilent 1100 高效液相色谱仪, UV1100 紫外检测器, AS3130 电子天平 (梅特勒仪器公司), Model TJ2R 离心机 (美国贝克曼公司), QL2901 漩涡混匀器 (海门市其林贝尔仪器有限公司), F6/10 匀浆器 (齐力特实验设备有限公司), 氨基 aminopropyl 固相萃取柱 (500 mg, Varian 公司)。

乙腈为色谱纯, 甲酸、磷酸氢二钾、正己烷及其它试剂均为分析纯。甲苯咪唑、羟基甲苯咪唑和氨基甲苯咪唑标准品购自 Sigma 公司, 先以甲酸溶解, 再加乙腈稀释成不同浓度的标准溶液。

1.2 色谱条件 Hypersil ODS C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 大连依力特公司; 流动相为乙腈 - 10 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (30 : 70, V/V), pH 6.2; 流速 0.8 mL/min; 检测波长 290 nm; 柱温 30 ; 进样体积 20 μL。

1.3 鳊鱼给药方法 从养鳊实验场购买 60 条欧鳊, 重为 120 g 左右, 分别暂养于 3 个循环充气水族

箱中, 每箱 20 条, 水体积约 100 L/箱, 水温 25 , pH 7.0 ~ 7.5。一周后, 停止水循环, 加入终浓度为 1 mg/L 的甲苯咪唑进行药浴处理鳊鱼。给药前, 先从每箱中各取出一条欧鳊, 作为空白对照。药浴处理开始后 2 h、4 h、8 h、12 h、24 h 分别从 3 个水族箱中各取出一条鳊鱼测定其各组织器官的药物含量。药浴 24 h 后打开循环水, 在 1 h 内将 3 个水族箱中的含药水替换成新鲜水, 结束用药。随后 2 h、4 h、8 h、12 h、24 h、36 h、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d、8 d、10 d、12 d 分别从 3 个水族箱中取出一条欧鳊检测其各组织器官提取液中的药物浓度。

1.4 样品采集及其前处理 活鳊放置 - 70 冰箱中冻死后解剖, 剪下肝脏、肾脏、脂肪、皮肤分别称重平均约 9.76 g、1.02 g、1.35 g、6.29 g, 另外同时切取约 50 g 鱼肉, 均置于 - 70 保存备用。每个组织器官样品匀浆后, 用 0.45 μm 膜过滤器过滤, 取 1 mL 匀浆液采用基质固相分散体系萃取药物<sup>[15-16]</sup>, 即每份匀浆液加入 0.1 mol/L 甲酸 1 mL, 再用水饱和的正己烷 2 mL 萃取, 反复萃取三次; 合并萃取液用氨基固相萃取柱分离净化浓缩后, 采用高效液相色谱法测定其中药物含量。

## 2 实验结果与分析

2.1 高效液相色谱法定量分析甲苯咪唑及其代谢物 采用反相高效液相色谱法分离及定量检测甲苯咪唑、羟基甲苯咪唑和氨基甲苯咪唑。以乙腈与 10 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 体积比 30 : 70, pH 6.2 为洗脱流动相, 流速为 0.8 mL/min; 柱温恒定为 30 的条件下, 三者反相柱上的分离度较高 (见图 1), 可作为三者混合样品的色谱定量分析方法。以系列浓度分别为 5、10、25、50、100、125、150、200、250、300、400、500 ng/mL 的 MBZ、MBZ-OH 和 MBZ-NH<sub>2</sub> 标准溶液制作定量曲线 (见图 2)。结果表明, 甲苯咪唑、羟基甲苯咪唑和氨基甲苯咪唑分别在 25 ~ 500 ng/mL、50 ~ 400 ng/mL、50 ~ 500 ng/mL 浓度范围内线性关系良好。三者各平均峰面积 (y) 与对应浓度 (x) 的回归方程和相关系数见表 1。再以三者标准溶液连续稀释, 进样分析, 当 S/N = 3 为最低检测限, 测定结果表明本法检出 MBZ、MBZ-OH 和 MBZ-NH<sub>2</sub> 的最低浓度分别为 10、5、10 ng/mL。精确吸取甲苯咪唑、羟基甲苯咪唑和氨基甲苯咪唑标准品溶液 (200 ng/mL), 连续进样 6 次, 测得三者的峰面积 RSD 分别为 1.5%、1.2%、1.8%, 表明本方法精密度良好。

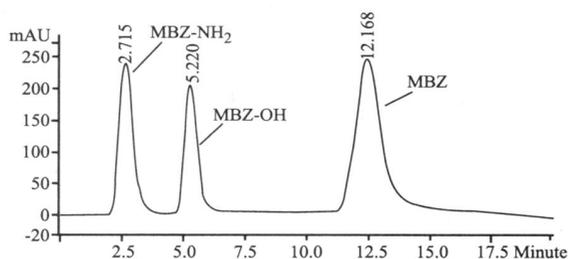


图 1 甲苯咪唑、羟基甲苯咪唑和氨基甲苯咪唑的 RP - HPLC 色谱图

表 1 甲苯咪唑、羟基甲苯咪唑和氨基甲苯咪唑的线性方程和检出限

化合物	线性方程	相关系数 $R$	线性范围 / ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	检出限 / ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
甲苯咪唑	$y = 98.705x - 1833.7$	0.9989	25 ~ 500	10
羟基甲苯咪唑	$y = 58.126x - 1739.6$	0.9991	50 ~ 400	5
氨基甲苯咪唑	$y = 77.457x - 2397.2$	0.9986	50 ~ 500	10

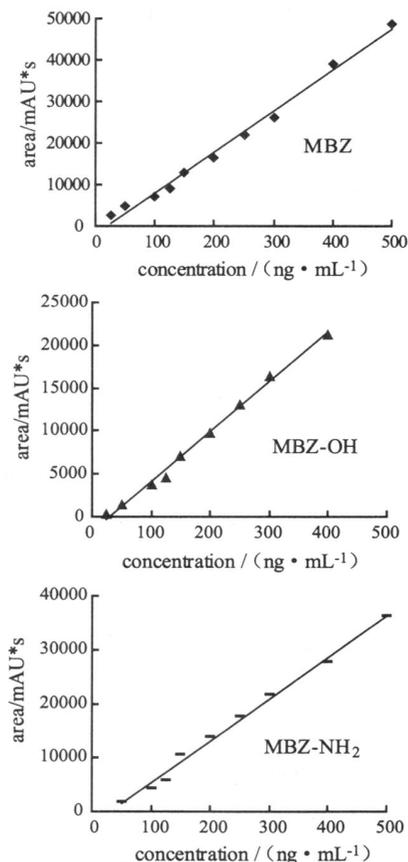


图 2 甲苯咪唑、羟基甲苯咪唑和氨基甲苯咪唑的线性曲线图

2.2 本方法的精密度和样品回收率 取未经药浴处理鳊鱼的鱼肉匀浆液,分别准确添加连续稀释的适量甲苯咪唑、羟基甲苯咪唑和氨基甲苯咪唑标准溶液,按 1.4 样品前处理方法制备加样回收供试溶液,再用 HPLC 测定其含量,获得最低检出浓度分别为 0.01 ng/mg、0.05 ng/mg、0.05 ng/mg,并计算三者的回收率分别为 86%、90%、72%。

于空白欧鳊鱼肉匀浆液中,加入浓度均为 1 ng/mg 的甲苯咪唑、羟基甲苯咪唑和氨基甲苯咪唑标准溶液,按照 1.4 样品前处理方法操作,每浓度 6 样本分析,连续测定 3 d。根据当日的标准曲线,计算样品的浓度,对结果进行方差分析,计算本法的精密度与准确度,结果见表 2。

表 2 甲苯咪唑、羟基甲苯咪唑和氨基甲苯咪唑的方法精密度与准确度

化合物	日内变异系数 $RSD / \%$	日间变异系数 $RSD / \%$
甲苯咪唑	3.6	4.1
羟基甲苯咪唑	2.4	2.9
氨基甲苯咪唑	4.3	6.5

2.3 甲苯咪唑在欧鳊脏器中的吸收代谢 用 1 mg/L 甲苯咪唑水体浸泡欧鳊,按 1.3 方法定时取样,经样品预处理后,分别采用 RP - HPLC 测定各脏器提取液及药浴水体中 MBZ、MBZ - OH 和 MBZ - NH<sub>2</sub> 的含量,数据处理结果见表 3。实验结果表明,甲苯咪唑在水体中,自身不会降解成其他化合物。欧鳊经甲苯咪唑药浴后,其皮肤和脂肪可快速吸收 MBZ,在 24 h 时分别达到最大吸收量 3.89 ng/mg 和 6.75 ng/mg;同时 MBZ 在肝脏和肾脏中代谢成羟基甲苯咪唑和氨基甲苯咪唑。在用药后 12 h 内,皮肤、脂肪、肌肉和肾脏提取液中 MBZ 的浓度远高于其代谢产物,而在肝脏提取液中 MBZ - OH 的浓度远高于 MBZ 和 MBZ - NH<sub>2</sub> 含量;

表 3 甲苯咪唑在欧鳊体内的吸收和代谢分析

化合物	药浴时间 /h	皮肤	脂肪	肌肉	肝脏	肾脏	水样
甲苯咪唑 / ( $\text{ng} \cdot \text{mg}^{-1}$ )	12	3.66	4.84	1.89	1.67	2.37	0.70
	24	3.89	6.75	2.16	0.66	2.95	0.49
羟基甲苯咪唑 / ( $\text{ng} \cdot \text{mg}^{-1}$ )	12	1.51	0.82	0.48	3.63	1.26	
	24	1.10	0.49	0.40	1.48	1.44	
氨基甲苯咪唑 / ( $\text{ng} \cdot \text{mg}^{-1}$ )	12	0.32	0.08	0.35	1.24	0.69	
	24	0.78	0.16	0.50	1.59	1.80	

注:水样中的药物单位为  $\mu\text{g/mL}$ 。

且在 12 h 时肝脏和肾脏内 MBZ - OH 和 MBZ - NH<sub>2</sub> 的比例分别约为 3 : 1 与 2 : 1, 而在 24 h 时两者比例接近, 均说明肝肾迅速将甲苯咪唑代谢为 MBZ - OH, MBZ 在欧鳗体内先被还原成羟基甲苯咪唑, 而后继续被代谢为氨基甲苯咪唑。在鳗鱼肉中, 甲苯咪唑及其代谢产物的含量均较低。

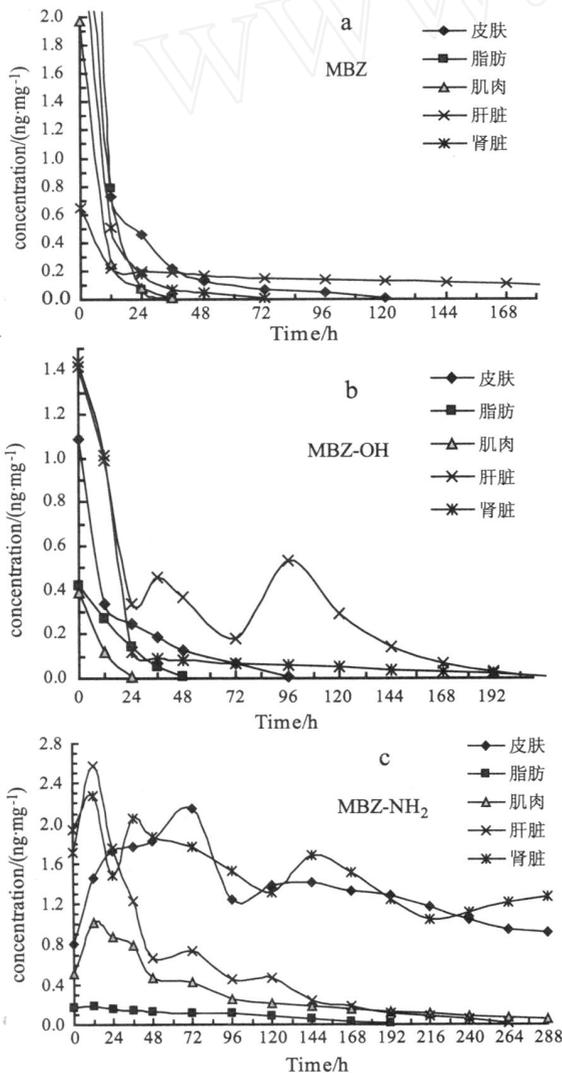
2.4 甲苯咪唑及其代谢物在欧鳗组织中的代谢残留分析 药浴处理结束后, 定时采集欧鳗皮肤、脂肪、肌肉、肝脏和肾脏, 根据样品提取液的 RP - HPLC 测定结果 (见图 3) 进一步证明, 甲苯咪唑在鳗体内可代谢为 MBZ - OH 和 MBZ - NH<sub>2</sub>。在停药 12 h 后, 皮肤、肌肉、肝脏和肾脏提取液中 MBZ - NH<sub>2</sub> 的浓度远高于 MBZ 和 MBZ - OH, 说明其中 MBZ - NH<sub>2</sub> 是主要代谢产物。

从图 3a 中可见, 欧鳗皮肤、脂肪、肌肉、肝脏和肾脏分别在停药后 5 d、1.5 d、1.5 d、12 d、3 d 时仍可以检测到微量甲苯咪唑 (0.01 ng/mg); 肌肉和脂肪在 1 d 后甲苯咪唑的残余含量均低于国际上 MBZ 残留最高限量 (0.1 ng/mg), 而其余器脏的 MBZ 残留量低于 0.1 ng/mg 的代谢时间分别为肾脏 1.5 d、皮肤 3 d、肝脏 9 d。

由图 3b 和 3c 可看出甲苯咪唑代谢物 MBZ - OH 和 MBZ - NH<sub>2</sub> 在欧鳗 5 组织中的分布规律。图 3b 中停药 36 h 后, MBZ - OH 主要分布于皮肤、肝脏和肾脏内, 且分别在停药后 4 d、9 d、9 d 时仍可检测到微量甲苯咪唑; 而在皮肤、脂肪、肌肉、肝脏和肾脏中低于限量 0.1 ng/mg 的残留时间分别为 3 d、1.5 d、1 d、7 d、1.5 d。图 3c 中停药后 12 h 时, 甲苯咪唑在欧鳗肝肾内代谢成 MBZ - NH<sub>2</sub> 达到高峰, 浓度分别为 2.58 ng/mg 和 2.27 ng/mg; 皮肤、脂肪、肌肉中 MBZ - NH<sub>2</sub> 在 3 d、12 h、12 h 时达到浓度高峰, 分别为 2.15 ng/mg、0.19 ng/mg、1.02 ng/mg; MBZ - NH<sub>2</sub> 在鳗脂肪中含量很低, 且停药 5 d 后降至 0.09 ng/mg; MBZ - NH<sub>2</sub> 在鳗鱼肉中含量较低, 停药 9 d 后降至 0.08 ng/mg, 在肝脏中 MBZ - NH<sub>2</sub> 消除速度比皮肤和肾脏中快得多, 在停药后 9 d 肝脏内降至 0.10 ng/mg, 而停药后 12 d 时, 皮肤和肾脏中 MBZ - NH<sub>2</sub> 含量仍维持较高水平, 分别为 0.92 ng/mg、1.27 ng/mg。

### 3 讨论

本实验利用杀虫药甲苯咪唑药浴处理欧洲鳗, 并采用反相高效液相色谱法分析甲苯咪唑及其代谢产物在欧鳗组织器官中的分布和残留情况。欧鳗药浴时, 快速吸收水中的甲苯咪唑, 并将其代谢转化成羟基甲苯咪唑和氨基甲苯咪唑。此结果与已报道的相关文献<sup>[4-7]</sup>一致, 即与甲苯咪唑在其他动物体内代谢的结论吻合, 且氨基甲苯咪唑是甲苯咪唑在欧鳗体内代谢的主要产物。鳗药浴时测得皮肤中 MBZ 含量较高, 虽然众所公认鱼类吸收药物的主要器官是鳃, 但并不排除经过皮肤和体表粘液吸收一部分药物。甲苯咪唑在肝脏和肾脏中均被代谢成 MBZ - NH<sub>2</sub> 和 MBZ - OH, 说明了虽然肝脏是有机体中外源性物质代谢的主要器官, 但肾脏也具有一定的代谢能力。本实验结果表明, 甲苯咪唑主要残留于欧鳗的肝脏和肾脏内, 且主要成



a - 甲苯咪唑; b - 羟基甲苯咪唑; c - 氨基甲苯咪唑

图 3 甲苯咪唑及其代谢产物在欧鳗体内的残留分析

分是其代谢产物 MBZ - NH<sub>2</sub> 和 MBZ - OH;除了鳃皮肤外, MBZ和 MBZ - OH在欧鳗各脏器中降解消除速度快,但 MBZ - NH<sub>2</sub>在欧鳗此五部分组织器官中残留时间长,短时间内无法彻底降解。因此,虽然目前我们关注了甲苯咪唑残留毒性,但其代谢产物 MBZ - NH<sub>2</sub> 残留问题也应该得到足够重视,在合理用药和制定休药期时同样需要给予考虑。

### 参考文献:

- [1] Tolstoj V A, Lytvynets A, Langrova I Pro - oxidant Effects of Mebendazole in Albino Rats Experimentally Infected with *Trichinella spiralis* [J]. Parasitol Res, 2007, 100: 1277 - 1280.
- [2] Stig Mellergaard Mebendazole Treatment against *Pseudodactygyms* Infections in Eel *Amguilla anguilla* [J]. Aquaculture, 1990, 91: 15 - 21.
- [3] 张宝忠, 陈会波, 翁燕珍, 等. 甲苯咪唑治疗欧洲鳗伪指环虫病的研究 [J]. 水利渔业, 1997, 1: 21 - 22.
- [4] 林炫锋. 甲苯咪唑在鳗病防治上的应用 [J]. 中国水产, 1998, 12: 29.
- [5] 殷为勇, 郑荣远, 杨学志, 等. 甲苯咪唑药物不良反应文献分析 [J]. 药物流行病学杂志, 2008, 17(2): 84 - 87.
- [6] Brugmans J P, Thienpont D C, Van Wijngaarden I, et al Mebendazole in Enterobiasis: Radio Chemical and Pilot Clinical Study in 1278 Subjects [J]. JAMA, 1971, 217: 313 - 316.
- [7] Allan R J, and Watson T R. Identification of Biliary Metabolites of Mebendazole in the Rat [J]. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 1982, 7: 131 - 136.
- [8] Meuldemans W E G, Hurkmans R M A, Lauwers W F J, et al The *In vitro* Metabolism of Mebendazole by Pig, Rat and Dog Liver Fractions [J]. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 1976, 1: 35 - 40.
- [9] Gottmans H, Kroker R, and Ungemach F R. Investigations on the Biotransformation of Mebendazole Using an Isolated Perfused Rat Gut System [J]. Xenobiotica, 1991, 21: 1431 - 1439.
- [10] 李志青, 樊海平, 曾占壮, 等. 复方甲苯咪唑对拟指环虫的杀灭效果和对欧洲鳗的毒性 [J]. 浙江农业学报, 2000, 12(4): 221 - 223.
- [11] 李海燕, 李桂峰. 甲苯咪唑对鱼的急性毒性试验及驱虫效果研究 [J]. 广州大学学报, 2005, 4(1): 33 - 35.
- [12] Steenbaar J G, Hajee C A, Haagsma N. High Performance Liquid Chromatographic Determination of the Anthelmintic Mebendazole in Eel Muscle Tissue [J]. J Chromatogr, 1993, 615(1): 186 - 190.
- [13] Valois M E, Takayanagi O M, Bonato P S, et al Determination of Albendazole Metabolites in Plasma by HPLC [J]. J Anal Toxicol, 1994, 18(2): 86 - 90.
- [14] Hajee C A J, Haagsma N. Liquid Chromatographic Determination of Mebendazole and its Metabolites Amino - mebendazole and Hydroxy - mebendazole in Eel Muscle Tissue [J]. J AOAC Int, 1996, 79: 645 - 651.
- [15] 乐涛, 余永新, 柳江英, 等. 固相萃取 - 反相高效液相色谱测定牛奶中米诺环素残留量的研究 [J]. 食品科学, 2008, 29(1): 270 - 272.
- [16] 辛丹敏, 周光明, 黄成, 等. 基质固相分散 - 高效液相色谱分析奶粉中残留的左旋咪唑和甲苯咪唑 [J]. 分析试验室, 2008, 27(S1): 365 - 367.

(上接第 4 页)

### 参考文献:

- [1] 中华人民共和国农业部. 无公害食品 猪肉 (NY5029 - 2001) 附录 E 磺胺类药物在动物可食性组织中残留的高效液相色谱检测方法 [S].
- [2] 王曼霞, 林黎明, 刘心同, 等. 高效液相色谱法测定动物组织中 8 种磺胺类药物残留量 [J]. 化学分析计量, 2004, 13(2): 14 - 16.
- [3] 吴银良, 赵莉, 刘鲁军, 等. 固相萃取 - 高效液相色谱法同时测定牛奶中残留的 9 种磺胺类药物 [J]. 色谱, 2007, 25(5): 728 - 731.
- [4] 林海丹, 谢守新, 冯德雄, 等. 动物源性食品中磺胺类药物残留的固相萃取 - 高效液相色谱法测定 [J]. 分析测试学报, 2003, 22(1): 94 - 96.
- [5] 董丹, 邵兵, 吴永宁, 等. 液相色谱 - 电喷雾串联四极杆质谱法测定鸡肉中 17 种磺胺类药物的残留 [J]. 色谱, 2005, 23(4): 404 - 407.
- [6] 农业部 781 号公告 - 12 - 2006 牛奶中磺胺类药物残留测定液相色谱 - 串联质谱法 [S].
- [7] Forti A F, Scortichini G. Determination of Ten Sulphonamides in Egg by Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry [J]. Anal Chim Acta, 2009, 637(1/2): 214 - 219.